Der Einfluß aliphatischer Alkohole und Aldehyde auf die Coenzym A-Aktivität in der Leber weißer Mäuse

---

von

Merwine Wagner

aus Braunschweig

1967

1967 № 36

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41535725_0086

Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität
Erlangen-Nürnberg
Direktor: Prof. Dr. F. Heim

Der Einfluß aliphatischer Alkohole und Aldehyde auf die Coenzym A-Aktivität in der Leber weißer Mäuse

Dissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde

der

Hohen Medizinischen Fakultät

der

Friedrich-Alexander-Universität

zu

Erlangen-Nürnberg

Vorgelegt von

Merwine W a g n e r

aus

Braunschweig

Gedruckt mit Erlaubnis der Medizinischen
Fakultät der Universität Erlangen-Nürnberg

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Dekan: Prof. Dr. K. Ober

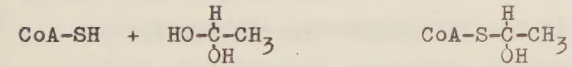
Referent: Prof. Dr. F. Heim

Tag der mündlichen Prüfung: 4.2.1967

Herrn Prof. Dr. F. Heim möchte ich für
die Überlassung des Themas und die
großzügige Unterstützung bei der
Ausführung dieser Arbeit sehr danken

Das von Lipmann entdeckte Coenzym A ist eine Verbindung, die im Stoffwechsel der Zelle eine wichtige Stellung einnimmt. Coenzym A zeigt einen relativ komplizierten Aufbau. Es enthält Adenosin-3,5-diphosphat, Pantothensäure und eine zu einem Cysteaminanteil gehörige SH-Gruppe. Letztere stellt die reaktionsfähige Gruppe des Coenzym dar, denn sie verbindet sich mit Säureresten zu Thioestern. Der Energieinhalt der Thioesterverbindung beträgt 8 Cal/Mol. Die Bedeutung des Coenzym A für den Stoffwechsel der Zelle liegt darin, daß durch die Bindung von Fettsäuren an das Coenzym diese aktiviert und damit wesentlich reaktionsfähiger werden. Die wichtigste Coenzym A-Verbindung ist wohl die aktivierte Essigsäure. Der beim Abbau der Kohlehydrate, der Fettsäuren und der desaminierten Aminosäuren entstandene Acetylrest wird nämlich an das Coenzym A gebunden und kann als aktivierte Essigsäure mit Hilfe von Enzymen auf Oxalessigsäure unter Bildung von Zitronensäure übertragen werden. Durch diese Reaktion wird der Zitronensäurezyklus in Gang gehalten, der für die oxydative Energiegewinnung der Zelle absolut notwendig ist. Neben der Einführung der Acetatreste in den Zitronensäurezyklus spielt das Coenzym A beim Auf- und Abbau der Fettsäuren, bei Entgiftungsreaktionen und weiteren anderen Vorgängen in der Zelle eine große Rolle.

Im Rahmen von Untersuchungen über den Einfluß des Äthylalkohols auf den Stoffwechsel des Zentralnervensystems und der Leber weißer Mäuse wurde beobachtet (Ammon; Ammon, Estler, Heim) , daß der Gehalt der genannten Organe an aktivem Coenzym A nach Verabreichung von Alkoholmengen zwischen 2-6 mg/g Körpergewicht stark abnahm. Von den Autoren wurde vermutet, daß nicht der Alkohol selbst diese Änderungen der Coenzym A-Aktivität hervorruft, sondern der beim Abbau des Alkohols in der Leber entstandene Acetaldehyd. Während also in der Leber der Aldehyd unmittelbar bei der Dehydrierung des Alkohols entsteht, besitzt das Gehirn wenig Aldehyddehydrogenase, sodaß in diesem Organ auch kaum Acetaldehyd gebildet werden kann. Doch gelangen offenbar auf dem Blutwege Acetaldehydmengen aus der Leber ins Gehirn, die für eine Hemmung des Coenzym A ausreichen. Der Acetaldehyd bzw. das Aldehydhydrat reagiert wahrscheinlich mit der SH-Gruppe des Coenzym A unter Bildung eines Semimercaptals nach folgender Gleichung:



Dieses Semimercaptal ist eine bei neutraler und schwach alkalischer Reaktion stabile Verbindung, die auch durch Erhitzen auf 100° C nicht zerfällt. Im Semimercaptal ist die funktionelle SH-Gruppe des Coenzym A blockiert, deshalb verliert das Coenzym A durch die Semimercaptalbildung seine transacetylierenden Eigen-

schaften .

Versuche an isolierten Leber- und Hirnmitochondrien (Ammon, Estler, Heim) haben ergeben, daß bereits durch 0,125 - 0,5 µMol Acetaldehyd / ml der Gehalt von Leber- und Hirnmitochondrien an aktivem Coenzym A signifikant herabgesetzt werden kann. Mit der Abnahme an Coenzym A geht eine Senkung des Sauerstoffverbrauchs der Mitochondrien einher, wenn ihnen Pyruvat als Atmungssubstrat angeboten wird. Bei den Lebermitochondrien besteht eine lineare Beziehung zwischen CoA-Gehalt und Pyruvatoxydation. Hirnmitochondrien dagegen sind selbst dann noch im stande, Pyruvat zu veratmen, wenn mit Hilfe des Kaplan-Lipmann-Testes aktives Coenzym A in den Hirnmitochondrien überhaupt nicht mehr nachweisbar ist. Es genügen demnach offenbar allerkleinste Mengen von CoenzymA, um dem Gehirn eine geringe Veratmung von Pyruvat zu ermöglichen.

In vorliegender Arbeit sollte untersucht werden, welchen Einfluß außer Äthanol und Acetaldehyd andere Alkohole und Aldehyde nach intravenöser Injektion auf den Gehalt der Leber weißer Mäuse an Coenzym A ausüben. In die Untersuchungen einbezogen wurden Methanol, Äthanol, Propanol, Formaldehyd, Acetaldehyd, Propionaldehyd, Glykolaldehyd und Aceton.

Methodik

Die Versuche wurden an weißen männlichen Mäusen des Stammes NMRI, die bei einer Raumtemperatur von 24° C und Standardkost Altromin gehalten wurden, durchgeführt.

Die Versuchssubstanzen wurden als wässrige Lösungen intravenös injiziert, wobei die injizierte Flüssigkeitsmenge 0,01 ml/g Körpergewicht nicht überschritt. Die Injektionsdauer betrug 2-6 min. Das Ende der Injektion stellt in den Abbildungen den Zeitpunkt 0 dar. Zu verschiedenen Zeiten nach Ende der Injektion wurden die Tiere durch Eintauchen in flüssige Luft getötet und die Lebern in gefrorenem Zustand herauspräpariert. Die Coenzym A-Bestimmung erfolgte nach der von Tabor und Mitarb. modifizierten Methode von Kaplan und Lipmann, die auf der Acetylierung von p-Nitroanilin durch Coenzym A und der anschließenden kolorimetrischen Bestimmung des nichtacetylierten p-Nitroanilin beruht.

Bereitung des Organkochsaftes: Ein Teil gefrorene Leber wird mit neun Teilen siedendem Wasser übergossen, homogenisiert, drei Minuten in siedendem Wasserbad gehalten und anschließend sofort zur Abkühlung in ein Eisbad gebracht. Anschließend wird 20 min bei 5000 U/min zentrifugiert. Vom Überstand werden 0,1 ml in den Test eingesetzt.

Bei der Bestimmung des Coenzym A-Gehaltes wurde im einzelnen wie folgt verfahren: In Kunststoffzentrifugenbecher werden folgende Lösungen pipettiert:

0,02 ml einer frisch bereiteten m-$NaHCO_3$-Lösung
0,053 ml 0,11 m Glutathion (reduziert)
0,07 ml Reaktionsgemisch: 6 ml 0,06 m ATP,
6 ml 0,2 m Natr.citric.
0,75 ml m Natr.acetic.

0,12 ml 0,0025 m p-Nitroanilin
0,1 ml der auf Coenzym A zu untersuchenden Flüssigkeit (Organkochsaft)
0,064 ml gealtertes Taubenleberferment
Die Becher werden mit Gummistopfen verschlossen und 2 Stunden bei 37° C im Wasserbad inkubiert. Im Anschluß daran wird in jeden Becher 1 ml einer 5% igen Trichloressigsäure gegeben. Der entstandene Niederschlag wird 5 min bei 10 000 U/min abzentrifugiert und der Überstand in bereitgestellte , nummerierte Reagenzgläser gegossen und im PMQ II-Photometer (Fa. Carl Zeiss) bei 400 mμ in einer 1 cm-Küvette gemessen.
Aufstellung der Eichkurve: Es wurde dazu eine wässrige Lösung von Coenzym A verwendet, die 50γ 75% iges Coenzym A im ml enthält. In aufsteigender Reihe werden zwischen 0,45 und 2,7γ Coenzym A zu den Testansätzen gegeben. Die erhaltenen Extinktionswerte werden als Kurve aufgetragen und anhand dieser Kurve die unbekannten Coenzym A-Werte aus den Organkochsäften abgelesen. Das Taubenleberferment, das das für den Test wichtige Fermentsystem enthält, wurde nach Angaben von Lynen und Mitarb. hergestellt.
Die Anzahl der Versuchstiere , aus denen sich die jeweiligen Mittelwerte zusammensetzen, betrug 10 - 15. Die Unterschiede der Mittelwerte der einzelnen Versuchsgruppen gegenüber den Kontrolltieren wurde mit Hilfe des t-Testes überprüft. Sie wurden als signifikant angesehen, wenn $P \leq 0{,}05$.

Versuchsergebnisse

Die Tiere erhielten intravenös als wassrige Lösungen 10 µMol/g Methanol, 10 µMol/g Äthanol, 10 µMol/g Propanol, 1,5 µMol/g Formaldehyd, 4 µMol/g Acetaldehyd, 5 µMol/g Propionaliehyd, 12 µMol/g Paraldehyd, 10 µMol/g Glykolaldehyd, und 80 µMol/g Aceton.

Die untersuchten Aldehyde konnten nicht alle in der gleichen molaren Konzentration untersucht werden, da ihre Toxicität für die weiße Maus sehr unterschiedlich war. Wir haben deshalb in Vorversuchen die LD_{50} der untersuchten Aldehyde bestimmt und sie im eigentlichen Versuch, in dem ihr Einfluß auf die Coenzym A-Aktivität ermittelt wurde, in einer Dosierung verabreicht, die 50 - 75% der LD_{50} betrug.

Wie aus der Abbildung hervorgeht, wird durch die drei homologen Alkohole Methanol, Äthanol und Propanol in einer Menge von 10 µMol /g Körpergewicht intravenös verabreicht, der Coenzym A-Gehalt der Leber unterschiedlich stark, lange und schnell gesenkt. Die stärkste Hemmung ergibt sich nach Propanol, die längste Hemmung nach Methanol. Die den Alkoholen entsprechenden Aldehyde Formaldehyd, Acetaldehyd und Propionaldehyd wirken wesentlich rascher als die Alkohole. Während das Wirkungsmaximum von Äthanol und Propanol nach 60 Minuten und vom Methanol erst nach 120 Minuten erreicht wird, tritt nach Verabreichung der Aldehyde das Maximum der Senkung des Coenzym A in der Leber bereits 2 Minuten nach Beendigung der Injektion ein. Die Wirkungsdauer beträgt

beim Propionaldehyd, Acetaldehyd und Paraldehyd 5 Minuten, beim Formaldehyd 30 Minuten, während nach Glykolaldehyd die Abnahme der Coenzym A-Aktivität erst nach einer Stunde beendet ist. Selbst die hohe Dosis von 40 µMol/g Aceton hat sich als unwirksam erwiesen.

Diskussion

Da die Coenzym A-hemmende Dosis einerseits, die für die weiße Maus letale Dosis andererseits bei den von uns untersuchten Alkoholen und Aldehyden sehr verschieden waren, konnten nicht bei allen Verbindungen isomolare Mengen untersucht und miteinander verglichen werden. Unter den Alkoholen, die sämtlich in einer Menge von 10 Mol/g Körpergewicht intravenös verabreicht wurden, übte Propanol die stärkste und Methanol die längste Wirkung auf die Coenzym A-Aktivität in der Leber aus. Methanol und Äthanol besitzen wahrscheinlich eine geringere Affinität zur Alkoholdehydrogenase als Propanol und werden deshalb langsamer zu den eigentlich Coenzym A-hemmenden Verbindungen, den Aldehyden, abgebaut. Für die Annahme, daß, ähnlich wie bei Äthanol, auch bei den anderen untersuchten Alkoholen nicht diese selbst, sondern die intermediär in der Leber aus den Alkoholen entstehenden Aldehyde die Coenzym A-Aktivität hemmen, spricht der Befund, daß die Blockierung von Coenzym A durch die Aldehyde sehr schnell einsetzt; denn die maximale Hemmwirkung wird bei diesen bereits

nach 2 Minuten, bei den Alkoholen dagegen erst nach 30-120 Minuten erreicht. Außerdem sind die Aldehyde wirksamer als die zugehörigen Alkohole, denn eine signifikante Abnahme von Coenzym A tritt bereits nach Verabreichung von 1,5 - 5 Mol/g Körpergewicht auf. Die Coenzym A-hemmende Wirkung der Aldehyde würde sicher noch starker und von noch längerer Dauer sein, wenn sie nicht einem offenbar sehr raschen Abbau durch die Aldehyddehydrogenase unterliegen würden. Die wesentlich länger anhaltende Wirkung der Alkohole ergibt sich wahrscheinlich aus deren Wirkung als Depot, aus dem durch Dehydrierung am Ort der Coenzym A-Blockierung laufend der wirksame Aldehyd entsteht. Wie die Coenzym A-blockierende Wirkung des Glykolaldehyd zeigt, behindert die Hydroxylierung des zweiten C-Atoms des Acetaldehyd die Reaktion der Aldehydgruppe mit der SH-Gruppe des Coenzym A nicht, während, wie die Wirkungslosigkeit des Acetons zeigt, Carbonylgruppen allein zur Blokkierung der funktionellen SH-Gruppe des Coenzym A nicht imstande sind.

Zusammenfassung

In vorliegender Arbeit wurde der Einfluß mehrerer aliphatischer Alkohole und Aldehyde, nämlich des Methanol, Äthanol, Propanol, des Formaldehyd, Acetaldehyd und Propionaldehyd sowie des Paraldehyd, Glycolaldehyd und Aceton auf die Coenzym A-Aktivität der Leber weißer Mäuse untersucht. Die genannten

Verbindungen wurden intravenös injiziert. Mit Ausnahme des Aceton führten die untersuchten Alkohole und Aldehyde zu einer Abnahme der Coenzym A-Aktivität in der Leber, die ihr Maximum bei den Alkoholen 30-120 Minuten, bei den Aldehyden bereits 2 Minuten nach Beendigung der Injektion erreichte. Die Ergebnisse werden als weiterer Hinweis dafür angesehen, daß nicht die Alkohole selbst, sondern die aus ihnen intermediär entstandenen Aldehyde zur Abnahme der Coenzym A-Aktivität führen. Sie bilden sehr wahrscheinlich mit der funktionellen SH-Gruppe des Coenzym A ein Semimercaptal, d.h. eine stabile Verbindung, durch die die funktionelle SH-Gruppe des Coenzym A blockiert ist und das Coenzym so seine transacetylierenden Eigenschaften verliert.

Literatur

H.P.T. Ammon, C.-J. Estler u. F. Heim:
Der Einfluß von Äthylalkohol auf den Kohlehydrat- und Energiestoffwechsel des Gehirns weißer Mäuse
Arch.int.Pharmacodyn. 154, 108, 1965

H.P.T. Ammon, C.-J. Estler u. F. Heim:
Akute Äthanolvergiftung und Leberstoffwechsel
Arch.int.Pharmacodyn. 159, 258, 1966

F. Heim, H.P.T. Ammon, C.-J. Estler u. D. Mikschiczek:
Funktion und Stoffwechsel des Gehirns unter der Einwirkung von niederen Alkoholkonzentrationen
Med.Pharmakol.exp. 13, 361, 1965

H.P.T. Ammon:
Zum Mechanismus der Coenzym A-Inaktivierung nach Verabreichung von Äthanol
Naunyn.Schmiedebergs Arch. exp.Path.u. Pharmak. 251, 114, 1965

N.O. Kaplan and F. Lipmann:
The assay and distribution of coenzyme A
J.biol.chem. 174, 37, 1948

H. Tabor, A. Mehler and E. Stadtmann,
J.biol.chem. 207, 127, 1953

G. Fickeis:
Der Einfluß halogenierter Alkohole und Aldehyde auf den Gehalt der Leber an transacetylierendem Coenzym A
Dissertation, Erlangen 1966

L.S. Goodman and A. Gilman:
The Pharmacological basis of Therapeutics
The Macmillan Company New York 1965

T. Sollmann:
A Manual of Pharmacology
W.B. Saunders Company Philadelphia-London 1957

K.O. Möller:
Pharmakologie
Benno Schwabe & Co. Basel (Stuttgart 1961)

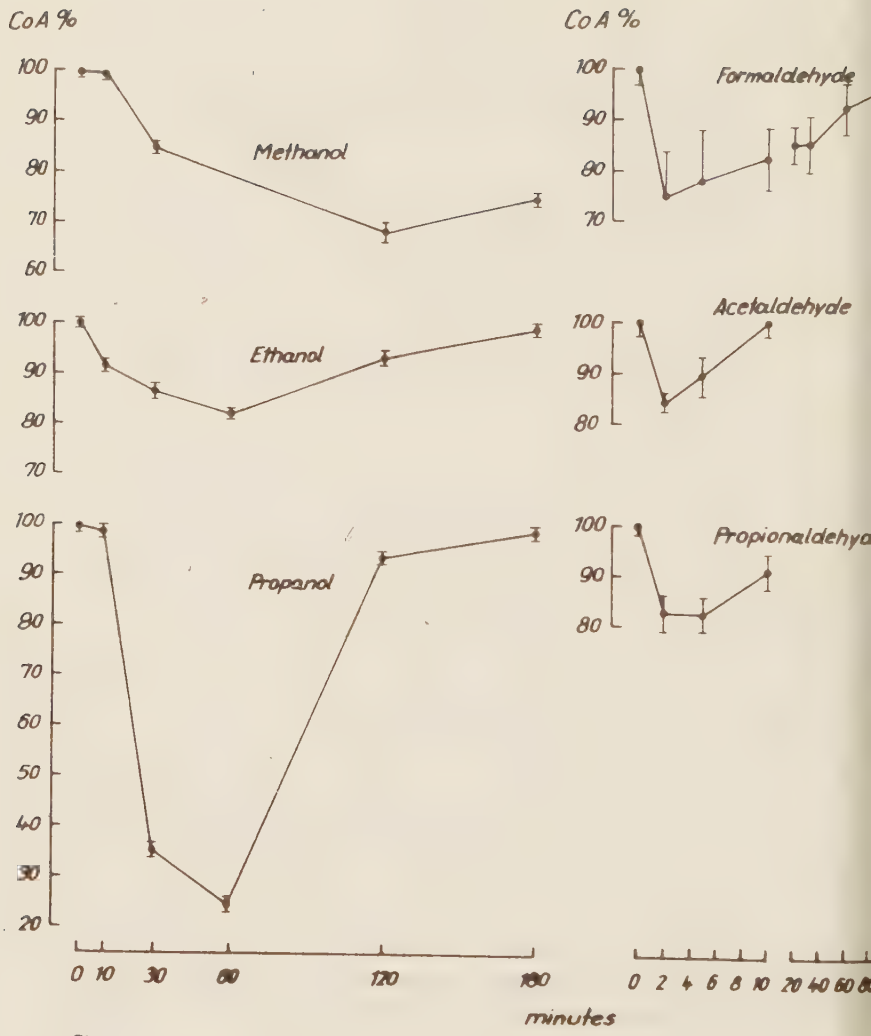

CoA %
100
90
80
70
60
Methanol
Ethanol
50
40
30
20
Propanol
0 10 30 60 120 180
minutes
CoA %
Formaldehyde
Acetaldehyde
Propionaldehyde
0 2 4 6 8 10 20 40 60

Fig. 1

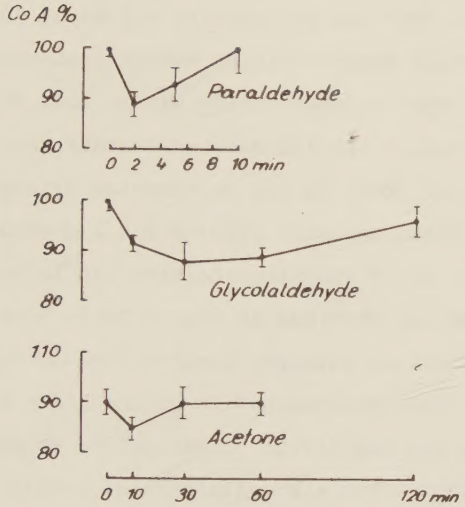

Co A %
100
90
80
Paraldehyde
0 2 4 6 8 10 min
100
90
80
Glycolaldehyde
110
90
80
Acetone
0 10 30 60 120 min

Fig. 2

Lebenslauf

Am 31.10.1940 wurde ich als Tochter des damaligen Reichsbahnrats Walter Wagner in Braunschweig geboren. In Minden/Westf. besuchte ich 4 Jahre von Ostern 1947 bis 1951 die Volksschule und wurde dann auf das dortige Neusprachliche Madchengymnasium umgeschult. 1954 verzogen meine Eltern nach Nürnberg; hier besuchte ich die Mädchenoberrealschule I bis zum Abitur 1960. An der Universitat Erlangen begann ich im Wintersemester 1960/61 mit dem Studium der Medizin. Das Vorphysikum bestand ich im Frühjahr 1962 und das Physikum im Sommer 1963. Nach weiteren 6 Semestern in Erlangen beendete ich am 16.1.1967 vor dem Prüfungsausschuß in Erlangen die ärztliche Prüfung mit dem Urteil " sehr gut ". Ab März 1967 beabsichtige ich als Medizinalassistentin in München tätig zu sein.

Merwine Wagner

Offsetdruck - Fotodruck
Josef Hogl
8520 Erlangen, Brüxerstraße 9, (Nähe Röthelheimbad,) Tel. 15336

Offsetdruck - Fotodruck
- J. Hogl, Erlangen, Brüxer Straße 9, (Nähe Röthelheimbad) Telefon 15336 -